



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia



Trabajo Fin de Grado

# **DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN RELACIONADOS CON ENFERMEDADES CANCERÍGENAS Y NEURODEGENERATIVAS**

**Tania Salas Arias**







**Departamento de Química Analítica**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DEL ACEITE DE OLIVA  
VIRGEN RELACIONADOS CON ENFERMEDADES  
CANCERÍGENAS Y NEURODEGENERATIVAS**

**Trabajo de Fin de Grado**

**Trabajo Bibliográfico**

**Autora:** Tania Salas Arias

**Tutor:** Ramón Aparicio Ruiz

**Grado en Farmacia**

Sevilla, Septiembre 2019



## RESUMEN

El aceite de oliva virgen (AOV) es el zumo extraído del fruto del olivo, uno de los alimentos más populares y recomendados en el marco de una dieta saludable. La actividad biológica y sus propiedades antioxidantes desempeñan un papel importante en la prevención de la oxidación continua, proceso importante en el desarrollo de distintas enfermedades. En este trabajo se ha planteado evaluar las distintas técnicas analíticas empleadas para la determinación de los compuestos del AOV relacionados con enfermedades, tanto neurodegenerativas como cancerígenas.

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por un aumento del estrés oxidativo, siendo minimizado por la presencia de fenoles y ácidos grasos, cuya determinación se lleva a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases (GC), respectivamente. Por otra parte, en el AOV podemos encontrar clorofilas, carotenoides, tocoferoles y compuestos triterpénicos cuya determinación se realiza mediante HPLC, entre los que predomina su actividad frente a las enfermedades cancerígenas.

Además, el AOV puede sufrir un deterioro o una contaminación debido a la presencia de trazas metálicas o plaguicidas, cuya detección se realiza mediante técnicas atómicas y GC, respectivamente. Asimismo, puede soportar grandes cambios químicos o físicos debido a un mal almacenamiento o por calentamiento mediante la fritura, que da lugar a la aparición de la acroleína y los compuestos polares. También podría darse la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) por contaminación ambiental. El método de determinación de la acroleína se basa en una cromatografía líquida con detección electroquímica pulsada. Mediante la GC se pueden evaluar los distintos compuestos polares contenidos en la muestra de AOV, mientras que los HAPs se determinan en HPLC sobre fase inversa con detector de fluorescencia (HPLC-FLD), pudiendo originar una notable repercusión en la salud de los seres humanos.

**Palabras clave:** *aceite de oliva virgen, antioxidantes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cancerígenas, cromatografía.*



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. ACEITE DE OLIVA: generalidades	1
1.1.1. Definición y clasificación del aceite de oliva virgen	2
1.1.2. Orígenes y composición	4
1.1.3. Parámetros que definen la calidad del AOV	6
1.1.4. Criterios de pureza	8
1.2. EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN Y LA SALUD HUMANA	11
1.2.1. Piel	12
1.2.2. Enfermedades inflamatorias	12
1.2.3. Diabetes	12
1.2.4. Colesterol	13
1.2.5. Enfermedades cardiovasculares	13
1.2.6. Cáncer	14
1.2.7. Enfermedades neurodegenerativas	14
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>3. METODOLOGÍA</b>	<b>17</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>18</b>
4.1. Compuestos presentes en el AOV en condiciones óptimas	18
4.1.1. Determinación de compuestos del AOV “fresco” relacionados con el cáncer	18
4.1.2. Determinación de compuestos del AOV “fresco” relacionados con enfermedades neurodegenerativas	23
4.2. Compuestos presentes en el aceite de oliva virgen alterado, deteriorado o contaminado	28
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>35</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>36</b>





## 1. INTRODUCCIÓN

Los frutos procedentes del olivo son unas drupas ovaladas, denominadas aceitunas u olivas, cuya composición es la siguiente: agua (60 – 70%), lípidos (10 – 25%), azúcares (3 – 6%), fibra (1 – 4%), proteínas (1 – 3%) y otros compuestos minoritarios como hidrocarburos, biofenoles, terpenos, alcoholes, esteroides, clorofilas, pigmentos carotenoides y compuestos volátiles. La calidad, tanto del aceite de oliva como de las aceitunas de mesa, depende de la composición química y las propiedades físicas de la aceituna, que a su vez están relacionadas con la variedad de aceituna, su grado de maduración, las condiciones ambientales, la región de crecimiento y las técnicas de almacenamiento y procesamiento (Gandul-Rojas et al., 2016).

### 1.1. ACEITE DE OLIVA: generalidades

El aceite de oliva virgen es el zumo extraído mecánicamente del fruto del olivo (*Olea europaea* L.), a través de procesos de molturación, batido y centrifugación, permitiendo conservar importantes compuestos polifenólicos, que le proporcionan un gran valor alimenticio, cosmético, medicinal, además de un agradable gusto y aroma (COI, 2018).

La obtención del aceite consta de varias etapas. La primera es la recepción, dónde se prepara la aceituna para la etapa posterior. La molienda, que puede realizarse en molinos de piedra, tradicionalmente, o de martillos o discos, que se incluyen en las instalaciones modernas. También existe una variante mixta en la que se incluye el homogeneizador de cuchillas o dientes. Posteriormente, se realiza un batido para obtener la separación del aceite. Y, por último, la extracción de las fases grasa (aceite), sólida (orujo) y acuosa (aguas de vegetación). La extracción se produce mediante tres tipos de sistemas (**Tabla 1**) (CAR/PL, 2000).

La siguiente etapa es la limpieza del aceite, que se puede realizar mediante filtrado por filtro de malla, por decantación en pozuelos y/o por centrifugación en centrifugadora vertical de alta velocidad. El almacenamiento se realiza en tanques de acero inoxidable, controlando la temperatura constantemente mediante un pirómetro óptico, que mantiene una atmósfera de gas inerte de oxidación garantizando la calidad y frescura de la elaboración de los productos. Y, por último, el fraccionamiento y envasado, es una fase crítica que culmina con la obtención del aceite. Esta etapa debe cumplir las normas de calidad exigibles (CAR/PL, 2000).

**Tabla 1:** Comparación entre los sistemas de extracción del aceite de oliva.

	Sistema de prensas o tradicional	Sistema continuo de tres fases	Sistema continuo de dos fases
<b>Proceso</b>	El prensado se realiza mediante prensas hidráulicas	La centrífuga horizontal, ("decánter"), produce la separación del aceite de la masa por centrifugación. Resultado: aceite, alpechín y orujo (residuo sólido)	El "decánter" separa el aceite y mezcla el orujo y las aguas de vegetación en una sola fase pastosa, el alperujo.
<b>Ventajas</b>	Método rápido	Sistema continuo, simplificación mecánica, eliminación de capachos, menor mano de obra, y ocupa menor superficie.	Ahorro de energía, agua e impacto ambiental. El "decánter" es más simple, menor precio, y la calidad del aceite mayor
<b>Inconvenientes</b>	Sistema discontinuo, formado por ciclos de prensa secuenciales.	Mayor consumo de agua, mayor contaminación y gran cantidad de alpechín	El rendimiento del aceite es menor ya se queda más retenido en el sólido.

#### 1.1.1. Definición y clasificación del aceite de oliva virgen

Según el Consejo Oleícola Internacional, el aceite de oliva puede denominarse de distintas formas (**Figura 1**):

- Aceite de oliva virgen (AOV): obtenido únicamente mediante procedimientos mecánicos o físicos, que no produzcan la alteración del aceite. Los aptos para el consumo en la forma que se obtienen son:
  - o Aceite de oliva virgen extra: cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,8 gramos por 100 gramos.
  - o Aceite de oliva virgen: cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 2 gramos por 100 gramos.
  - o Aceite de oliva virgen corriente: cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 3,3 gramos por 100 gramos.
- Aceite de oliva virgen lampante: no es apto para el consumo. Su acidez libre es superior al 3,3%. Destinado al refinado o a usos técnicos.

- Aceite de oliva refinado: obtenido por refinado de aceites de oliva vírgenes, sin alterar su estructura glicerídica inicial. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,3 gramos por 100 gramos, debido a la neutralización.
- Aceite de oliva: mezcla de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 1 gramo por 100 gramos.
- Aceite de orujo de oliva: obtenido mediante disolventes o procedimientos físicos de los orujos de oliva, con exclusión de los que se obtienen por reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza. Se comercializa según:
  - Aceite de orujo de oliva crudo: destinado al refino para usos técnicos o consumo humano.
  - Aceite de orujo de oliva refinado: obtenido por refinado a partir del aceite de orujo de oliva crudo, sin provocar alteraciones de la estructura glicerídica inicial. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,3 gramos por 100 gramos.
  - Aceite de orujo de oliva: mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y de aceite de oliva virgen apto para el consumo. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 1 gramo por 100 gramos.

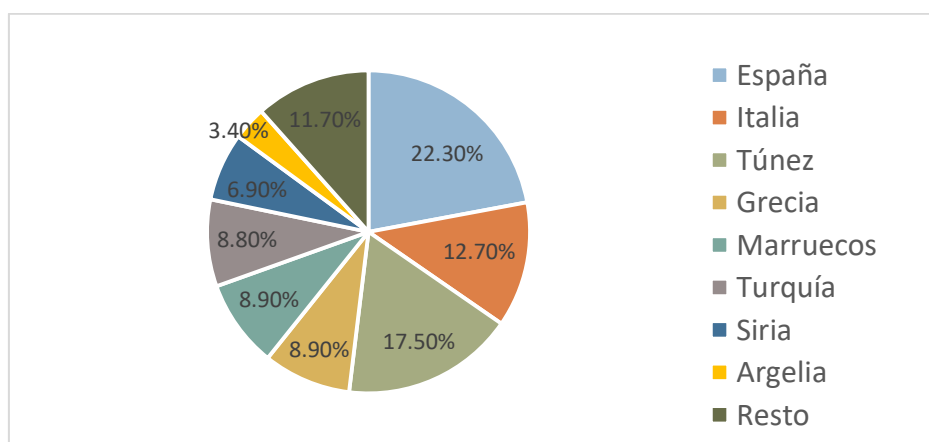


**Figura 1:** Tipos de aceites de oliva y de orujo de oliva.

### 1.1.2. Orígenes y composición

El origen del olivo se remonta al 3000 - 4000 a.C., en Asia Menor y el Oriente Próximo. Su cultivo fue una de las primeras actividades postrecolectoras, que recibió el nombre de centros de domesticación del olivo en Siria e Irán y en Nubia. En el siglo IX a.C., se introdujo en la Península Ibérica por los fenicios, que comerciaban en distintos puertos del Mediterráneo. Con el descubrimiento de América se extendió su cultivo y la expansión se realizó de Oriente a Occidente a través de las dos orillas del Mediterráneo, llegando a ser el árbol más representativo. Se cultiva en casi cuarenta países de todo el mundo, teniendo especial relevancia en todo el área mediterránea (Ruiz, 2015).

La evolución del cultivo del olivo se ha extendido en los últimos años (**Figura 2**), con un aumento de casi el 21% en los últimos veinte años a nivel mundial, excepto en algunos países de la Unión Europea (UE). La producción de aceite de oliva más alta corresponde a España (60,3% del total), seguida de Italia (23,9%), Grecia (13,6%), Portugal (1,8%), y de otros países como Francia, Chipre, Eslovenia y Malta aportando el 0,4% de la producción en la UE. España es considerado el primer país productor de aceite de oliva en la UE y del mundo (Ruiz, 2015).



**Figura 2:** Distribución porcentual de la superficie mundial del olivar (Ruiz, 2015).

Los compuestos químicos del aceite oliva pueden clasificarse en dos grupos (**Tabla 3**):

- **Fracción saponificable (98-99%):** constituida por triglicéridos, ácidos grasos libres, ésteres de ácidos grasos con alcoholes grasos saturados de cadena lineal conocidos como ceras, ésteres de esteroides y, finalmente, alcoholes terpénicos. Es la fracción necesaria para sintetizar las grasas (Ruiz, 2015). En la **Tabla 2** se muestra la composición de los ácidos grasos presentes en el AOV.

**Tabla 2:** Composición de ácidos grasos del aceite de oliva (Ruiz, 2015).

<b>Ácidos grasos saturados</b>	Mirístico	C 14:0
	Palmítico	C 16:0
	Heptadecanoico	C 17:0
	Esteárico	C 18:0
	Araquídico	C 20:0
	Behénico	C 22:0
	Lignocérico	C 24:0
<b>Ácidos grasos monoinsaturados</b>	Palmitoleico	C 16:1
	Heptadecenoico	C 17:1
	Oleico	C 18:1
	Eicosenoico	C 20:1
<b>Ácidos grasos poliinsaturados</b>	Linoleico	C 18:2
	Linolénico	C 18:3

- **Fracción insaponificable (1-2%):** compuesta principalmente por terpenos y compuestos esteroídicos. Responsable del color, el sabor y el aroma; le proporciona propiedades antioxidantes y antiinflamatorias beneficiosas para la salud (Ruiz, 2015).

**Tabla 3:** Composición química del aceite de oliva virgen.

<b>Fracción saponificable</b>	<b>Fracción insaponificable</b>
Triacilgliceroles	Compuestos fenólicos
Ácidos grasos	Esteroles
Monoacilgliceroles	Tocoferoles
Diacilgliceroles	Alcoholes grasos
Ceras	Hidrocarburos
Fosfolípidos	Compuestos volátiles
Alcoholes terpénicos	Pigmentos (clorofilas, feofitinas y carotenoides)

### 1.1.3. Parámetros que definen la calidad del AOV

La medición, tanto de parámetros químicos como de aspectos sensoriales, permite estimar la calidad del aceite de oliva. La medición de la calidad es independiente de la variedad de olivo y del fruto que se ha extraído, aunque cada variedad de fruto proporciona unas cualidades organolépticas determinadas (Martínez, 2006).

#### **Parámetros químicos.**

Entre los parámetros químicos que definen la calidad del AOV se encuentran:

- **Grado o índice de acidez:** muestra la cantidad de ácidos grasos libres presentes en el aceite, expresado en porcentaje de ácido oleico. Los ácidos grasos libres son el resultado de una aceituna defectuosa o de un deterioro durante la recolección y/o transporte (Ruiz, 2015). Por tanto, a menor acidez, mayor grado de calidad.
- **Índice de peróxidos:** determina el estado de oxidación inicial de un aceite y se expresa en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de grasa. Los peróxidos se forman si el aceite no se protege de la luz y el calor, no se almacena en los envases adecuados o si la aceituna está dañada (Ruiz, 2015). Por ello, a mayor índice de peróxidos, menor capacidad antioxidante.
- **Absorbancia o medida espectrofotométrica en el ultravioleta (UV):** detectan compuestos procedentes de la oxidación secundaria, la mayoría de tipo carboxílico. Predominan los cromóforos, que incluyen las cetonas  $\alpha$ -insaturadas y las  $\alpha$ -dicetonas, que absorben en la región de los 270 nm. Se expresa mediante el coeficiente de extinción  $K_{270}$ , mientras mayor sea su valor, menor capacidad antioxidante tendrá el aceite. Las asociaciones moleculares, de tipo peróxido, que proceden del ácido linoleico, absorben en la región de los 230 - 235 nm, denominándose  $K_{232}$  (Ruiz, 2015).
- **Determinación de la humedad y de materias volátiles, incluyendo el cálculo de impurezas insolubles en éter y la existencia de trazas metálicas:** estos compuestos influyen de forma importante en los procesos de filtrado y comercialización de los aceites. La determinación de la humedad y de las materias volátiles se realiza a través de una calorimetría diferencial a 103 °C en estufa de aire forzado hasta pesada constante. La cuantificación de las impurezas insolubles en petróleo se realiza disolviendo el aceite en exceso de éter, pasando la disolución por un sistema de filtrado que después se lleva a 103 °C, hasta pesada constante (Quirantes et al., 2010).

En la **Tabla 4**, a modo de resumen, se encuentran todas las técnicas analíticas aplicadas en la determinación de cada uno de los parámetros de calidad mencionados anteriormente.

**Tabla 4:** Técnica analítica empleada para determinar cada parámetro de calidad.

	Parámetro	Técnica analítica empleada
<b>Calidad</b>	Acidez	Valoración ácido-base
	Índice de peróxidos	Valoración redox
	Absorbancia a 270 y 232 nm	Espectrofotometría
	Humedad y materias volátiles	Calorimetría diferencial
	Impurezas insolubles en éter de petróleo y trazas metálicas	

#### Valoración organoléptica.

El análisis sensorial determina la categoría de un aceite de oliva y la clasificación de éste. Los caracteres organolépticos son vitales para conocer su estado de salud y posibles alteraciones o defectos. Los criterios para la valoración de las características organolépticas del AOV se definen en el punto 1 del anexo del Reglamento nº 136/66/CEE.

El análisis sensorial de aceites debe realizarse utilizando un panel de catadores, seleccionados y entrenados para dicha evaluación. La norma COI/T20/Doc nº13/Rev 1 define el método de selección de catadores, para constituir un grupo cuyas evaluaciones sean fiables para constituir un panel de cata adecuado. La cata de aceites se lleva a cabo en una sala que debe cumplir los requisitos descritos en la norma UNE-EN ISO 8589, con el fin de evitar que las condiciones ambientales interfieran en la respuesta de los catadores, los cuales deben realizar la cata en cabinas independientes (**Figura 3**), también descritas en la misma norma.



**Figura 3:** Cabina individual para la cata del aceite de oliva (Loyola et al., 2008).

El aceite se clasifica en función de dos parámetros: la mediana de los defectos y la del atributo frutado (**Tabla 5**). Por mediana de los defectos se refiere a la mediana del atributo negativo percibido con mayor intensidad. Dicho valor debe ser inferior o igual al 20%. Según la clasificación descrita en el REGLAMENTO (CEE) nº 2568/91, el aceite se clasifica en:

**Tabla 5:** Comparación de parámetros entre las variedades de aceite de oliva.

	Parámetro	Aceite de Oliva Virgen Extra	Aceite de Oliva Virgen	Aceite de Oliva Refinado
<b>Análisis físico- químico</b>	Acidez	$\leq 0,8$	$\leq 2,0$	$\leq 0,3$
	Índice de peróxidos	$\leq 20$	$\leq 20$	$\leq 5$
	K <sub>232</sub>	$\leq 2,50$	$\leq 2,60$	--
	K <sub>270</sub>	$\leq 0,22$	$\leq 0,25$	$\leq 1,1$
	$\Delta K$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,16$
<b>Análisis organoléptico</b>	Mediana del defecto	0	$\leq 2,5$	--
	Mediana del frutado	$> 0$	$> 0$	--

#### 1.1.4. Criterios de pureza

Las determinaciones para detectar posibles adulteraciones en los aceites son la composición de triglicéridos, el perfil de ácidos grasos y esteroides, así como la cuantificación del contenido en ceras, alcoholes alifáticos, eritrodiol y uvaol, estigmastadienos y 2-monopalmitato. Estas determinaciones son más complejas que las relacionadas con los parámetros de calidad, y requieren de técnicas analíticas más sofisticadas, como la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución (Quirantes et al., 2010).

##### Determinación de ceras

Las ceras presentes en el aceite de oliva se separan en función del número de átomos de carbono. Este método diferencia el aceite de oliva de presión del que se obtiene a partir del aceite de orujo. El aceite se fracciona mediante cromatografía con columna de gel de sílice hidratado. La fracción eluida, cuya polaridad es menor que la de los triglicéridos, se recupera y se analiza mediante la técnica de cromatografía de gases con columna capilar (COI, 2003).



La presencia de ceras en cantidades superiores a las normales puede significar la adulteración por aceite de orujo o temperaturas muy altas en la elaboración. Si el contenido de ceras se encuentra entre 300 y 350 mg/kg se debe determinar el contenido de los alcoholes alifáticos, eritrodíol y uvaol (COI, 2003). Por lo tanto, la presencia de ceras en una muestra facilita la detección de mezclas con aceites de orujo de oliva y refinados de oliva.

#### Determinación de estigmastadienos en aceite vegetales

Este método es útil para detectar estigmastadienos en aceites vegetales refinados y en AOV. Su determinación solo es válida cuando el contenido se encuentra entre 0,01 y 4,0 mg/kg. En primer lugar, se realiza el aislamiento de la fracción insaponificable. Posteriormente, mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, se determina la separación de la fracción de hidrocarburos esteroideos y se analiza por cromatografía de gases capilar (COI, 2017).

Cuando su concentración es superior a 4 mg/kg, si se quiere cuantificar se aplica el método para la determinación de esteranos en aceite refinado. La existencia de estos compuestos nos indica la presencia de aceites refinados sobre las mezclas de aceites de semillas con aceite de oliva (Quirantes et al., 2010).

#### Determinación del contenido en triglicéridos

Mediante esta técnica se permite calcular la diferencia absoluta entre valores experimentales de triglicéridos con número de carbono equivalente a 42 (ECN 42), obtenido del aceite mediante cromatografía líquida de alto rendimiento, y el valor teórico de triglicéridos con un ECN a 42 (teórico ECN 42), calculado a partir de los ácidos grasos (COI, 2017).

En este proceso es posible distinguir tres fases. En primer lugar, la determinación de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases capilar. Posteriormente, el cálculo teórico de triglicéridos con ECN 42 y, por último, la determinación por HPLC de triglicéridos en ECN 42 (COI, 2017). Mediante este método se permite verificar si hay mezcla de aceites de semillas con alto contenido en ácido linoleico (Quirantes et al., 2010).

#### Determinación de la composición de ácidos grasos

La determinación de la fracción de ácidos grasos y sus derivados, así como de la fracción insaponificable se lleva a cabo mediante cromatografía de gases. Los ácidos grasos libres suelen analizarse por cromatografía de gases con columnas capilares en forma de ésteres volátiles, sobre todo, ésteres metílicos. Los compuestos a analizar mediante esta técnica

deben ser volátiles y térmicamente estables (COI, 2017). En la **Tabla 6** se muestran los ácidos grasos más abundantes en el aceite de oliva.

**Tabla 6:** Porcentaje de cada ácido graso en el aceite de oliva.

Ácido graso	Abreviación	Porcentaje
Ácido palmítico	P	10,887%
Ácido palmitoleico	Po	1,097%
Ácido esteárico	S	2,942%
Ácido oleico	O	74,116%
Ácido linoleico	L	9,955%
Ácido linolénico	Ln	1,002%

La determinación de estos compuestos resulta útil ya que la composición de ácidos grasos y triglicéridos es característica de los distintos tipos y variedades de aceites, y cualquier alteración, ya sea con fines fraudulentos o bien a causa de la manipulación industrial, modifica su composición. Los ácidos grasos aislados se determinan, al igual que los libres, mediante una previa esterificación por cromatografía de gases (Quirantes et al., 2010).

#### Determinación de esteroides

La determinación de esteroides se lleva a cabo mediante una saponificación de la materia grasa, a la que se le añade  $\alpha$ -colestanol como patrón interno, con una solución etanólica de hidróxido potásico. A continuación, se extrae la fracción insaponificable con éter etílico. Los compuestos recuperados se transforman en trimetilsililéteres y se analizan por cromatografía de gases con columna capilar (COI, 2001).

La composición de esteroides es muy característica de cada tipo de aceite, por lo que en el caso del aceite de oliva la determinación de estos compuestos se utiliza normalmente para detectar mezclas fraudulentas con otros aceites (Quirantes et al., 2010). Para el aceite de oliva virgen el total de esteroides debe ser como mínimo 1.000 mg/kg. Los aceites extraídos con solvente poseen una cantidad superior, que puede ser reducida durante el proceso de refinado. La composición de esteroides permite detectar adulteraciones con otros aceites vegetales, ya que valores bajos de  $\beta$ -sitosterol indica que el aceite ha sufrido un proceso de refinación (CEE, 2013).

#### Determinación del contenido en eritrodiol y uvaol

El eritrodiol, formado por los dioles eritrodiol y uvaol, forma parte de la fracción insaponificable del AOV. Su concentración es mayor en los aceites de oliva obtenidos por extracción. Se determinan por cromatografía de gases y los picos de estos compuestos tienen tiempos de retención relativos, alrededor de 1,45 y 1,55, respectivamente (COI, 2018).

Los dialcoholes triterpénicos presentes en el aceite de oliva, como eritrodiol y uvaol, se pueden determinar junto con la fracción de esteroides. En algunos estudios se utiliza la técnica de HPLC acoplada al cromatógrafo de gases para realizar el fraccionamiento del insaponificable en sustitución de la cromatografía en capa fina, debido a los tiempos de elución tan elevados que presentan los esteroides (Quirantes et al., 2010). La presencia de estos compuestos es un criterio de pureza para detectar aceites de orujo en el aceite de oliva.

#### Determinación de alcoholes alifáticos

La determinación de los alcoholes alifáticos se lleva a cabo mediante una saponificación de la materia grasa, a la que se le añade 1-eicosanol como patrón interno, con una solución etanólica de hidróxido potásico. Posteriormente, se extrae la fracción insaponificable con éter etílico, y la fracción alcohólica mediante cromatografía en placa de gel de sílice básica. Los alcoholes que se recuperan se transforman en trimetilsililéteres y se analizan en cromatografía de gases con columna capilar (COI, 2018). La presencia de estos compuestos en las muestras de aceites revela adulteraciones del aceite de oliva, que ha podido ser contaminado por aceites de orujo.

#### Determinación del porcentaje de monopalmitato de 2-glicerilo

Mediante la cromatografía de gases capilar se determina el porcentaje de ácido palmítico en la posición 2 de los triglicéridos, a través de la evaluación del monopalmitato de 2-glicerilo. Solo se aplica a aceites vegetales líquidos a temperatura ambiente (20 °C) (COI, 2017).

La detección de monopalmitato de 2-glicerilo determina una alteración en la distribución natural de los ácidos grasos en la posición 2. Esto se debe a que se ha producido una transesterificación en el refinado.

### **1.2. EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN Y LA SALUD HUMANA**

La actividad biológica y las propiedades preventivas de los ácidos grasos monoinsaturados y, sobre todo, del ácido oleico y de los ácidos grasos poliinsaturados, le confieren al aceite de oliva una gran importancia para la salud (Martínez, 2006).

### 1.2.1. Piel

El envejecimiento produce un daño gradual y funcional de la piel. Uno de los principales cambios es la pérdida de elasticidad, el deterioro de la capacidad para reparar daños y la acumulación de colágeno, dando lugar a la aparición de fibrosis. Algunos factores externos, como los rayos de sol, al generar radicales libres, aceleran el envejecimiento. Sin embargo, es posible reducir el daño celular mediante inhibidores naturales. El principal es el aceite de oliva, ya que su perfil de lípidos es muy similar a la piel humana (COI, 2019).

Además, el aceite de oliva aporta grandes cantidades de vitaminas A, D y K, así como de vitamina E, siendo ésta la responsable de la protección contra los radicales libres causantes de la oxidación celular. Gracias a estos compuestos, resulta útil en terapias específicas para tratar trastornos de la piel como el acné, la psoriasis y eccemas seborreicos. Por otro lado, gracias a su efecto como antioxidante, desempeña un papel importante en la prevención de la oxidación continua, proceso que forma parte del desarrollo de ciertos tipos de cánceres de piel (COI, 2019).

### 1.2.2. Enfermedades inflamatorias

La respuesta inflamatoria alterada da lugar a las enfermedades inflamatorias crónicas inmunomediadas (IMID) como la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis múltiple y la psoriasis. Los polifenoles del AOV contribuyen a mejorar la inflamación local y sistémica en la EII, así como el estrés oxidativo, ya que regula las vías de señalización de la transcripción. La oleuropeína presente en el aceite de oliva virgen atenúa los daños inflamatorios en la colitis ulcerosa humana al reducir la expresión de COX-2 e IL-7, en las biopsias de colon estimuladas con lipopolisacáridos (Santangelo et al., 2018).

Los hábitos dietéticos influyen en la homeostasis intestinal. Los oxiesteroles procedentes de la oxidación del colesterol que se encuentran en los alimentos, ejercen efectos pro-oxidantes y pro-inflamatorios, alterando la capa epitelial intestinal y contribuyendo así a la patogénesis del intestino inflamatorio (Serra et al., 2018).

### 1.2.3. Diabetes

La dieta mediterránea ha resultado ser beneficiosa para el control de la glucemia y de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (Sánchez D Mesa, 2018). Diversos estudios han demostrado

que el aceite de oliva rico en ácidos grasos monoinsaturados, resulta beneficioso para controlar la glucemia en pacientes con intolerancia a la glucosa o que presentan DMT2, ya que se ha comprobado que estimulan específicamente la hormona antidiabética péptido-1 glucagón-like (GLP-1) (Zamora et al., 2004).

Por otro lado, se han publicado ensayos aleatorizados en pacientes diabéticos para evaluar el efecto de los polifenoles de la hoja de olivo, la oleuropeína e hidroxitirosol en altas concentraciones, sobre los marcadores de sensibilidad a la insulina, dando lugar a una disminución de las concentraciones sanguíneas de insulina y hemoglobina glicosilada, y mejorando la función de las células  $\beta$  pancreáticas (Sánchez D Mesa, 2018).

#### 1.2.4. Colesterol

Las dietas que presentan una gran cantidad de grasas animales elevan los niveles de colesterol en sangre, y éste es uno de los principales factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. La ingesta de AOV para las poblaciones mediterráneas es de 30 a 50 gramos al día, con una cantidad de fenoles ingeridos en el rango de 4 a 9 miligramos al día (Corona et al., 2009). Los lípidos son componentes importantes en las membranas neuronales y son esenciales para la función cerebral. Los ácidos grasos y el colesterol están particularmente presentes en las membranas sinápticas, ya que mejoran la fluidez de la membrana y contribuyen a la formación de microdominios especializados y balsas lipídicas, que son esenciales para la transmisión sináptica (Priore et al., 2017).

El aceite de oliva reduce los niveles de colesterol total en la sangre, colesterol LDL y triglicéridos. No altera los niveles de colesterol HDL, e incluso puede llegar a elevarlos, desempeñando un papel protector, previniendo la formación de parches grasos, y estimulando así la eliminación de las lipoproteínas de baja densidad (Priore et al., 2017).

#### 1.2.5. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de mortalidad en Europa. El aceite de oliva, grasa principal de la Dieta Mediterránea, es responsable de una menor incidencia de cardiopatías crónicas. Existe una gran variedad de células que producen especies reactivas de oxígeno (ROS), y el desequilibrio entre la formación de ROS y la capacidad de defensa antioxidante, es el estrés oxidativo. Cuando las células endoteliales se vuelven susceptibles al estrés oxidativo, se produce la activación de distintas cascadas de

señalización y factores transcripcionales que inducen una disfunción del endotelio, lo que conlleva al desarrollo de la aterosclerosis (Nocella et al., 2018).

El aceite de oliva tiene un papel preventivo y beneficioso en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. El ácido oleico es el contribuyente principal de estos efectos, junto con los ácidos grasos poliinsaturados, ya que poseen propiedades sobre la prevención y terapéutica de las patologías cardiovasculares, entre las que se encuentra el mantenimiento de un perfil lipídico favorable, reducción de los niveles de colesterol LDL y aumento de los niveles de HDL en el plasma sanguíneo, reduce la oxidación de las LDL, baja activación de las células mononucleares y de la pared vascular, reduce la presión arterial, incrementa la vasodilatación arterial, además de producir una disminución de la fibrinólisis y de la trombosis (Martínez, 2006).

#### 1.2.6. Cáncer

La importancia del aceite de oliva en la prevención del cáncer es debida a la presencia de los compuestos fenólicos como el hidroxitirosol, el tirosol, la oleuropeína, la oleuropeína agliconada, la aglicona y al oleocantal, incluyendo los derivados triterpénicos. Un metaanálisis realizado en 2014 definió que, una mayor adherencia a la Dieta Mediterránea se relacionaba con una reducción significativa del 13% de mortalidad por cáncer (Schwingshackl Hoffmann, 2014).

Estudios experimentales han demostrado que la oleuropeína actúa como agente anticancerígeno al interferir con el receptor de crecimiento epidérmico humano (HER2), mediante modificaciones epigenéticas, o por interferencia con la vía de las MAPK. Además, lleva a cabo la modulación de la apoptosis y el eje de señalización PI3K/AKT, así como la disminución de la producción de ROS en distintos tipos de células. Por otra parte, el oleocantal ha demostrado su capacidad para reducir el crecimiento del tumor, la supervivencia y la angiogénesis, demostrando su potencial metastásico (Ahmad et al., 2017).

#### 1.2.7. Enfermedades neurodegenerativas

Los trastornos neurodegenerativos se caracterizan por un aumento del estrés oxidativo, proceso que mejora tras la ingesta de aceite de oliva virgen, ya que atraviesa la barrera hematoencefálica. Además, cursan con inflamación, agregación anormal de proteínas, variación de la homeostasis del calcio, excitotoxicidad y apoptosis. Muchos estudios apoyan la importancia del hidroxitirosol y la oleuropeína en estas enfermedades ya que, al inhibir a las

COXs, eliminan directamente los radicales libres, ejerciendo una acción antioxidante en el tejido cerebral (Angeloni et al., 2017).

En un modelo experimental de Alzheimer, la administración crónica de AOV mejoró el aprendizaje y la memoria relacionada con la acumulación de las proteínas amiloides A $\beta$  y al daño oxidativo cerebral, produciendo un aumento de glutatión en el cerebro y de la actividad glutatión reductasa y superóxido dismutasa, disminuyendo así el depósito de proteínas A $\beta$  (Farr et al., 2012). Distintos modelos experimentales celulares y animales han mostrado que la oleuropeína agliconada evita la agregación de las proteínas A $\beta$ 42, con lo cual se evita su citotoxicidad, mientras que el tirosol y el hidroxitirosol también reducen el daño causado por la acumulación de proteínas A $\beta$  (Sánchez D Mesa, 2018).

El oleocantal evita la agregación de la proteína Tau, uno de los factores clave en la base de las enfermedades neurodegenerativas, además de mejorar varios biomarcadores relacionados con el desarrollo de esta enfermedad. Esta molécula también es capaz de reaccionar de manera covalente con los grupos lisina  $\epsilon$ -amino del fragmento Tau K18 de una manera inespecífica. Por tanto, el AOV y sus componentes fenólicos tiene un efecto beneficioso sobre el Alzheimer (Monti et al., 2012).

La segunda enfermedad neurodegenerativa crónica prevalente en las sociedades actuales es el Parkinson. Se caracteriza por una progresiva pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra cerebral y por acumulación de agregados proteicos en las neuronas. Estudios en modelos celulares de Parkinson han mostrado que el tirosol, el hidroxitirosol y la oleuropeína pueden atenuar el daño celular mediante distintos mecanismos (Angeloni et al., 2017). Además, estudios *in vitro* han demostrado los efectos protectores de la oleuropeína contra la apoptosis de células PC12 inducida por 6-hidroxidopamina, aportando propiedades neuroprotectoras y neurorestorativas de interés para el tratamiento del Parkinson (Rodríguez-Morató et al., 2015).

Por otro lado, la vitamina E ejerce un importante papel como antioxidante frente a enfermedades relacionadas con la edad, trastornos cardiovasculares o Alzheimer. El término general vitamina E se refiere a ocho especies naturales, siendo el alfa-tocoferol la forma más activa para el ser humano, ya que puede realizar la apoptosis directa o indirectamente en las células tumorales, dependiendo de la dosis, del tiempo de exposición y del tipo de células (Sayago et al., 2007).

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta revisión bibliográfica es la determinación de compuestos del aceite de oliva virgen relacionados con enfermedades cancerígenas y neurodegenerativas, abordando para ello diferentes objetivos parciales que se enumeran a continuación:

1. Revisión bibliográfica de todos los compuestos del aceite de oliva virgen en óptimas condiciones y su efecto en la salud, con especial énfasis en aquellos compuestos con actividad frente al cáncer y las enfermedades neurodegenerativas.
2. Estudio de las diferentes técnicas analíticas empleadas para la detección de los compuestos del AOV relacionados con enfermedades cancerígenas o neurodegenerativas.
3. Revisión bibliográfica de los compuestos presentes en el aceite de oliva virgen tras su alteración, deterioro o contaminación por distintas acciones como calentamiento (fritura), almacenamiento, presencia de trazas metálicas, plaguicidas o por la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) relacionados con el cáncer o enfermedades neurodegenerativas.
4. Estudio de las técnicas empleadas para la determinación de los compuestos presentes en el aceite de oliva virgen tras su alteración, deterioro y/o contaminación relacionados con el cáncer o con las enfermedades neurodegenerativas.



### 3. METODOLOGÍA

Para la elaboración de esta revisión bibliográfica se ha realizado una búsqueda de información sobre los métodos analíticos utilizados para determinar los distintos compuestos en el aceite de oliva en diferentes fuentes primarias, secundarias y terciarias. Para ello, se han utilizado bases de datos, libros, artículos científicos y normas de diferentes áreas, entre las que destacan, Química Analítica y Nutrición y Bromatología.

Para la Introducción se ha realizado una búsqueda de información principalmente en la página del Consejo Oleico Internacional (COI) y en Google Académico. También se ha obtenido información de las bases de datos Scopus, Dialnet y PubMed, en la cual la búsqueda se ha realizado a través de palabras claves, como “virgin olive oil”, “neurodegenerative diseases”, “hydroxytyrosol”, “Mediterranean diet”, “HPLC”, “chlorophyll” “phenolic compounds”, “antioxidant”, “neuroprotection”, “erythrodil”, “uvaol”, etc. Como medio de traducción se han empleado conocimientos propios de la lengua inglesa, consultando en caso de duda el diccionario Word Reference.

Los criterios en los que está basada la selección de los artículos científicos ha sido el siguiente: en primer lugar, se ha seleccionado aquellos que trataban principalmente sobre el AOV, ya que me interesaba conocer información sobre él y su composición, antes de profundizar en su relación con la salud humana. Una vez conocida su importancia, se ha seleccionado los artículos según el número de veces que han sido citados cada uno de ellos, escogiendo antes los que habían sido citados mayor número de veces. A partir de ahí, se ha destacado el año de publicación, predominando aquellos con datos más actualizados.

En el apartado de Resultados y Discusión la búsqueda se ha realizado a través de libros obtenidos de FAMA, distintas Tesis Doctorales, y artículos de SciELO, teniendo en cuenta la información obtenida de las normas y los artículos utilizados para la introducción.

Las distintas imágenes incluidas en esta revisión bibliográfica han sido obtenidas de diferentes libros y artículos científicos consultados. Las Figuras 1, 2, 4 y 9 han sido realizadas con Microsoft PowerPoint 2010.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizada la revisión bibliográfica, hemos podido conocer una parte de la actividad de los distintos componentes del aceite de oliva virgen, y su relación con la salud. Asimismo, en este apartado se abordarán con más detalle los compuestos presentes en el AOV implicados en el cáncer y en las enfermedades neurodegenerativas. Estos dos aspectos se evaluarán en dos apartados distintos, el primero se aborda teniendo en cuenta los compuestos del AOV en condiciones óptimas (mayor frescor), y el segundo, desde un punto de vista alterado, deteriorado y/o contaminado, ya sea por su largo periodo de almacenamiento, calentamiento (fritura), presencia de trazas metálicas, plaguicidas o de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).

##### 4.1. Compuestos presentes en el AOV en condiciones óptimas

Considerando el estudio realizado de los distintos compuestos presentes en el aceite de oliva virgen en condiciones óptimas, vamos a estudiarlos en profundidad, valorando su actividad y su relación con el cáncer o con las enfermedades neurodegenerativas.

##### 4.1.1. Determinación de compuestos del AOV “fresco” relacionados con el cáncer

En la compleja composición del AOV, se han encontrado diversos compuestos que tienen relación con efectos sobre el cáncer, entre ellos se encuentran pigmentos como las clorofilas y los carotenoides, los tocoferoles, distintos compuestos triterpénicos como el eritrodiol, uvaol, el ácido maslínico y el escualeno.

##### Clorofilas y carotenoides

La composición clorofílica y carotenoide en el AOV se clasifican según el grado de madurez de los frutos recolectados, el tiempo de permanencia en la fábrica y las condiciones en las que se ha realizado la extracción. Al madurar, la fracción clorofílica desaparece más rápidamente que la carotenoide, por lo que juegan un papel importante (Gandul-Rojas et al., 2016).

El aceite de oliva contiene clorofila “a” y clorofila “b”, que constituyen los pigmentos verdes, así como feofitina “a” y feofitina “b”, que forman los pigmentos marrones, siendo ambas moléculas las responsables del color del aceite. Las clorofilas y sus productos de degradación, las feofitinas y las feofórbidas, actúan como sensibilizadores para producir oxígeno en presencia de luz y oxígeno atmosférico, por lo que aceleran la oxidación del aceite. Por lo tanto, actúan como pro-oxidantes fuertes bajo la luz, aunque también pueden actuar como antioxidantes en la oscuridad (Choe and Min, 2006). Se ha detectado que la clorofila previene el ataque de una sustancia cancerígena llamada aflatoxina B1 (Ching-Yun et al., 2008), uno de

los carcinógenos más potentes que afecta al hígado, por lo que poseen actividad anticancerígena. Además, los derivados naturales de la clorofila han demostrado actividades biológicas significativas *in vitro* e *in vivo* basadas en la prevención del cáncer, incluyendo su actividad antioxidante, antimutagénica, la modulación de enzimas metabolizadoras xenobióticas y la inducción de eventos apoptóticos en líneas celulares de cáncer (Ferruzzi and Blakeslee, 2007).

Por otro lado, hay estudios que relacionan la carencia de ciertos carotenoides en la dieta, con la aparición de algunos tipos de cáncer, por lo que se consideran compuestos anticancerígenos. Varias investigaciones epidemiológicas han mostrado que el riesgo de padecer cáncer es inversamente proporcional al consumo de  $\beta$ -caroteno, siendo también eficaces en la prevención de la enfermedad otros carotenoides como la  $\beta$ -criptoxantina, la zeaxantina y el fitoeno. La protección de estos compuestos frente al cáncer se debe a su capacidad para inhibir la proliferación celular, la mejora de la diferenciación de células, la estimulación de la comunicación intercelular, o la capacidad para filtrar la luz azul, además de sus propiedades antioxidantes, entre otras (Meléndez-Martínez et al., 2004). Un estudio realizado demostró que el  $\beta$ -caroteno era también pro-oxidante del aceite en la oscuridad debido al mecanismo de transferencia de electrones en el estudio del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo con resonancia magnética nuclear (RMN) (Choe and Min, 2006).

Para la extracción de estos pigmentos se parte de una muestra de aceite disuelto en hexano, utilizando una columna de extracción en fase sólida de octadecyl ( $C_{18}$ ). Se acondiciona la fase estacionaria haciendo pasar el metanol, y se añade el hexano esperando que eluya toda la materia grasa. En la fracción de hexano que arrastra la materia grasa, también se incluye el  $\beta$ -caroteno que se recupera por saponificación (Gandul-Rojas et al., 2016).

La disolución final de pigmentos, libre de materia grasa, se lleva a sequedad y el residuo se disuelve en acetona. Antes de inyectarse el extracto en el cromatógrafo, se filtra a través de una membrana de nylon, siendo importante la realización de todas estas operaciones en total oscuridad o bajo luz verde, para evitar la alteración de los pigmentos. Por último, una alícuota de esta disolución se inyecta en el cromatógrafo y se mide la absorbancia a 430 nm mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las separaciones se realizan en una columna analítica C-18 Spherisorb ODS-2, y los pigmentos se eluyen utilizando un gradiente con una velocidad de flujo de 2ml/min (Gandul-Rojas et al., 2016).

## Tocoferoles

Los aceites vegetales constituyen una de las principales fuentes de aporte de vitamina E a través de la dieta, siendo ésta un grupo de ocho especies naturales de tocoferoles y tocotrienoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ). Dichas vitaminas están coordinadas junto con otras moléculas y enzimas para la defensa de las células frente a los efectos nocivos producidos por los radicales libres, considerándose importante por su efecto antioxidante (Sayago et al., 2007).

Diversos estudios han demostrado que los tocoferoles ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -tocoferol) poseen actividad anticancerígena, y confieren una mayor estabilidad durante los procesos de cocción como la fritura, evitando la formación de aminas heterocíclicas de gran poder cancerígeno (García, 2016). Los tocoferoles, principalmente el alfa-tocoferol, actúa como pro-oxidante cuando se encuentran en altas concentraciones en los aceites vegetales propagando radicales libres, que dependen de la concentración del hidroperóxido (Choe and Min, 2006).

La principal técnica utilizada para la separación de los distintos tocoferoles es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ya que solo basta con una dilución de la muestra a través de un disolvente que sea compatible con la fase móvil. Entre las variantes, destaca la técnica de HPLC en fase reversa, acoplado a detectores ópticos como UV-Vis, detectores de fluorescencia o de tipo electroquímico. Además, se ha descrito un método para la determinación de  $\alpha$  y  $\delta$  tocoferol mediante una extracción en continuo, seguida de una cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector coulombimétrico (Sayago et al., 2007).

Otra técnica es la cromatografía de gases y acoplamiento de HPLC en fase normal acompañado de fluorescencia y espectroscopia de masas. Las columnas utilizadas en fase normal permitían la separación de todos los isómeros del tocoferol, mientras que las de fase reversa no detectan el  $\beta$  y  $\gamma$ -tocoferol pero necesitaban menor tiempo para el equilibrio de la columna y una mayor reproductividad de los tiempos de retención. Además, la cromatografía de fluidos supercríticos acoplada a un detector UV-Vis también se ha utilizado para realizar esta determinación, junto con la espectroscopia de luminiscencia y fluorescencia (Sayago et al., 2007).

## Compuestos triterpénicos

La presencia de eritrodiol y uvaol es más abundante en la piel de la aceituna, por lo que se encuentran en mayores concentraciones en el aceite de orujo, ya que se obtiene a través de procesos químicos de los restos de aceituna una vez que se ha extraído mecánicamente el aceite (De la Osada, 2010). La actividad del uvaol frente al cáncer se describe por primera vez en 1976 en la línea leucémica P-388, con posteriores estudios que demostraron los efectos

antiproliferativos de este compuesto y su acción en el ciclo celular de la célula tumoral de la mama. Por otra parte, el eritrodiol también resultó poseer actividad antitumoral en cáncer de piel y en líneas tumorales humanas y de ratón con efectos proapoptóticos. Otro compuesto con efecto antitumoral, estudiado en cáncer de colon in vitro e in vivo es el ácido maslínico, con actividad antimetastásica en líneas tumorales de próstata humanas (DU145) mediante la inhibición de factores como el VEGF, las MMPs o el incremento de expresión de las proteínas Bid y Bax (Sánchez, 2014).

La determinación de los esteroides y los alcoholes triterpénicos, eritrodiol y uvaol, se lleva a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), sobre una columna de sílica gel, como ya se ha comentado en el Apartado 1.1.5 de la Introducción. Para ello se utiliza un gradiente de disolventes y un detector de luz UV a longitud de onda de 210 nm. Los esteroides y los dialcoholes triterpénicos se recogen en una sola fracción que se evapora y el residuo se silaniza para su posterior análisis por cromatografía de gases. Dicho análisis se lleva a cabo en condiciones isocráticas, y entre los reactivos empleados en este método se encuentran el éter dietílico, etanol, cloroformo, y piridina, junto a una disolución patrón de 2 mg/ml de  $\alpha$ -colestanol en cloroformo (Cert et al., 1997).

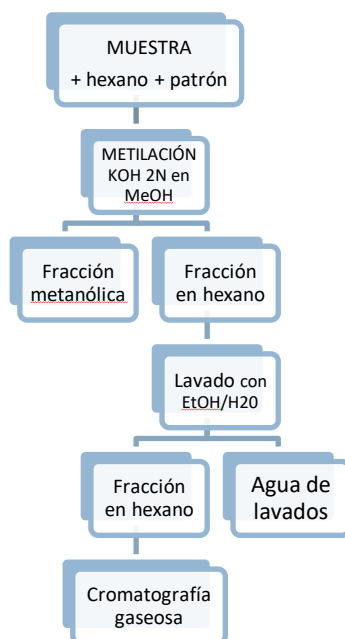
Para su determinación la muestra de aceite se calienta a reflujo con potasa etanólica y agua, extrayendo el insaponificable con éter etílico, y el extracto etéreo se lava con agua para eliminar los jabones. La fase etérea se filtra mediante un embudo que contiene sulfato sódico anhidro y se lava el sulfato con un poco de éter. La mitad de la disolución etérea se agita con una cantidad de alúmina desactivada, se filtra y se evapora a presión reducida hasta sequedad. El residuo se disuelve en 1 mL en una mezcla de hexano-éter dietílico en muestras de aceites de oliva y en 1,5 mL en el caso de aceites de orujo. Posteriormente, la disolución se inyecta en el cromatógrafo de líquidos. El eluido de la columna se recoge en un matraz, se evapora a presión reducida y se trata con un reactivo silanizante, analizando una alícuota de esa disolución en el cromatógrafo de gases (Cert et al., 1997).

Los esteroides y dialcoholes triterpénicos se cuantifican respecto al  $\alpha$ -colestanol utilizado como patrón interno, suponiendo para todos los compuestos el mismo factor de respuesta (Cert et al., 1997).

## Escualeno

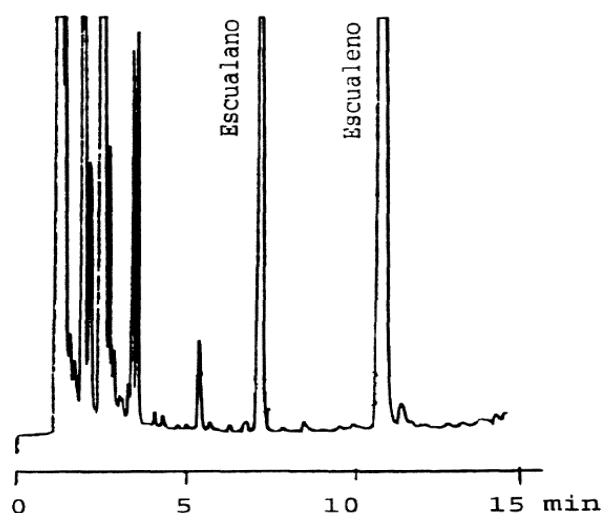
El aceite de oliva virgen contiene grandes cantidades de escualeno (entre el 0,2 y 0,7%), destacando por su actividad antioxidante y antitumoral. El escualeno es un hidrocarburo triterpénico que forma parte de la fracción insaponificable del aceite de oliva. Para la cuantificación se realiza una pesada de la muestra grasa y se añade hexano para disolverla, añadiéndole además la disolución patrón de escualano (1mg/1ml), agitándola para homogeneizar. A continuación, se le añade disolución KOH metanólica y se deja reposar. Con una pipeta se pasa una parte de la disolución de hexano a otro tubo de ensayo y se lava con una mezcla de etanol:agua 1:1 (v/v) (Lanzón et al., 1995).

Al final de los lavados y terminada la decantación de la disolución de hexano, se toma una muestra de la parte superior del tubo, y se inyecta en el cromatógrafo para determinar. Esta operación se llevó a cabo en una columna capilar SGL-5 (5% de difenilmetilsilicona), ligada químicamente. La temperatura del horno era de 250 °C, y la del detector e inyector de 300 °C, el gas portador de He con presión en cabeza de 120 KPa y con una relación de división de flujo 20:1 (Lanzón et al., 1995). En la **Figura 4** se muestra un esquema general del proceso.



**Figura 4:** Esquema para la determinación del escualeno (Lanzón et al., 1995).

En la **Figura 5** se puede observar un cromatograma resultado de la determinación del escualeno en una muestra de AOV.



**Figura 5:** Cromatograma de la determinación de escualeno en el AOV (Lanzón et al., 1995)

El escualeno es la interferencia mayoritaria en los extractos obtenidos a partir del aceite de oliva. Además del método anteriormente mencionado, para confirmar la presencia o ausencia de este compuesto los extractos purificados se pueden analizar por cromatografía de gases unida a un detector de ionización de llama (GC-FID). Este análisis se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases HRGC MEGA 2 Series, en una columna capilar de sílice fundida SGL-5, utilizando el hidrógeno como gas portador mientras que en la técnica anterior se utilizaba el helio. La presión en cabeza es de 80 kPa, con un flujo de 1 ml/min, utilizando la técnica de inyección “Cold On-Column” para aumentar la sensibilidad. La temperatura inicial del horno fue de 80 °C, con una rampa de 30 °C/min hasta alcanzar los 265 °C, y volviendo a las condiciones iniciales. La temperatura del detector fue de 300 °C y con N<sub>2</sub> como gas auxiliar (Rodríguez, 2005).

#### 4.1.2. Determinación de compuestos del AOV “fresco” relacionados con enfermedades neurodegenerativas.

La gran mayoría de los compuestos que constituyen el AOV son beneficiosos para la salud y, por tanto, para las enfermedades neurodegenerativas. Entre ellos destacan, los compuestos fenólicos y los ácidos grasos.

##### Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos forman parte de la fracción insaponificable del aceite de oliva. Además de su poder antioxidante, les proporciona un efecto quimioprotector en los seres humanos y les aporta estabilidad frente a la oxidación (Ruiz, 2015). Su porcentaje en el AOV es muy variable, depende de múltiples factores como el clima, la zona de cultivo, la variedad y

maduración de la fruta. Se han descrito más de 36 compuestos fenólicos, que se pueden agrupar en: ácidos fenólicos, derivados de oleuropeína, fenoles simples, flavonoides, lignanos e hidroxí-isocromonas (Godoy, 2013).

Entre ellos se encuentra el oleocantal, que ejerce un importante papel en el aclaramiento de A $\beta$  del cerebro a través de la regulación positiva de la glicoproteína P, y la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas LDL (LRP1), reduciendo la aparición del Alzheimer. Por otro lado, diversos estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de polifenoles reduce el riesgo de neurodegeneración y el declive cognitivo asociado a la edad. Durante el proceso oxidativo el cerebro genera una gran cantidad de radicales libres que dañan las células, y el hidroxitirosol es capaz de proteger a las células cerebrales frente a la peroxidación de los lípidos, ya que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Además, aunque en menor medida, el hidroxitirosol y el tirosol protegen la proliferación de células cancerígenas y la apoptosis de células epiteliales mamarias, originando una menor incidencia en cáncer de mama (Ferran, 2015), por lo que también están relacionados con el cáncer, aunque sus propiedades son más significativas en las enfermedades neurodegenerativas. Los procedimientos más ampliamente empleados para la extracción de la fracción fenólica del AOV son la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE) (**Tabla 7**).

**Tabla 7:** Comparación de las dos técnicas de extracción de compuestos fenólicos.

Extracción Líquido-Líquido (LLE)	Extracción en fase sólida (SPE)
Aceite previamente disuelto en hexano	Cartuchos C18
Disolvente extractante formado por distintas porciones de metanol/agua. Los mejores resultados se obtuvieron con una mezcla de 80:20 v/v.	Metanol como disolvente de elución
Ventaja: El rendimiento de recuperación de los derivados secoiridoides es mayor	Ventaja: Técnica más eficiente para extraer fenoles simples

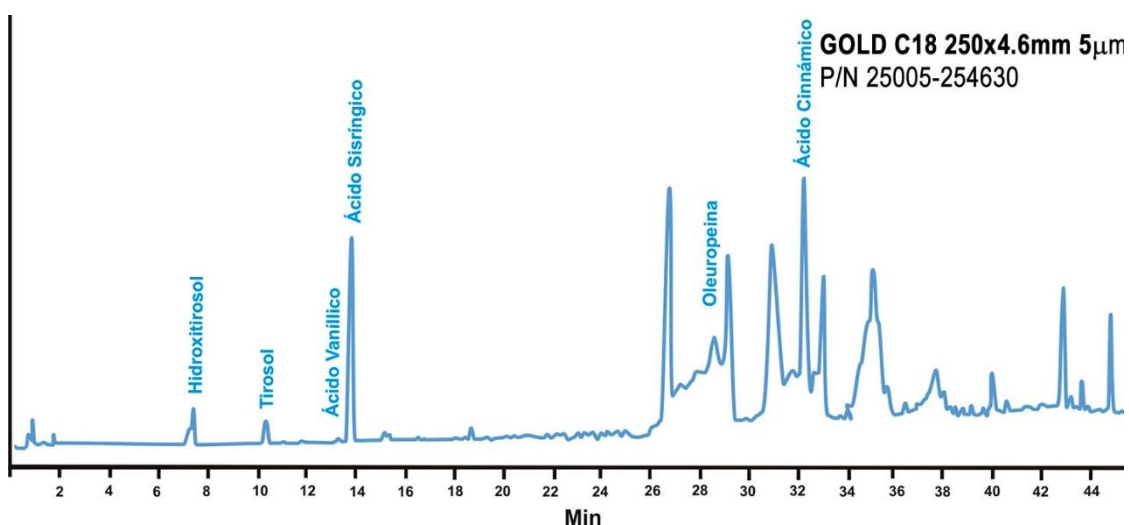
Hasta 1990, la mayoría de los artículos evaluaban los compuestos fenólicos del AOV relacionados con la utilización de métodos colorimétricos que empleaban el reactivo de Folin-Ciocalteu. Actualmente, estos métodos han sido reemplazados por técnicas de separación, tales como la cromatografía líquida, con distintos sistemas de detección, predominando el UV-Visible con detector de diodos en serie (DAD) y la espectroscopia de masas (Godoy, 2013).



La cromatografía líquida es la técnica más empleada en la determinación de fenoles. Principalmente se ha utilizado la elución en fase inversa y en gradiente. Las fases móviles más comunes son los sistemas binarios formados por un componente acuoso y un disolvente orgánico menos polar como metanol o acetonitrilo. Además, se le añade un ácido (acético o fosfórico), y la disminución de pH evita que se disocien los compuestos fenólicos (Godoy, 2013).

Para reducir el tiempo de análisis total se han utilizado alternativas como la cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UPLC), la cromatografía de resolución rápida (RRLC), o cromatografía líquida acoplada a técnicas quimiométricas. En lo relacionado con la detección, se emplean la espectrofotometría UV-visible y la espectrometría de masas, y en menor medida, la detección electroquímica y fluorescente. En la espectrometría de masas, la fuente de ionización más utilizada es la ionización por electrospray (ESI) (Godoy, 2013). De las distintas técnicas de determinación de los compuestos fenólicos, se pueden destacar dos tipos, entre las que encontramos la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía líquida de rendimiento ultraalto (UHPLC).

Con respecto a la técnica HPLC, se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución con gradiente ternario, provisto de una columna de fase inversa C18, de tipo Spherisorb ODS-2, junto con un revelador espectrofotométrico UV a 280 nm e integrador, operando a temperatura ambiente. Entre los reactivos se encuentran el ácido ortofosfórico 85% (v/v), junto con metanol, acetona y agua, utilizándose para la extracción una disolución de metanol:agua 80:20 (v/v) (COI, 2009).



**Figura 6:** Cromatograma de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen

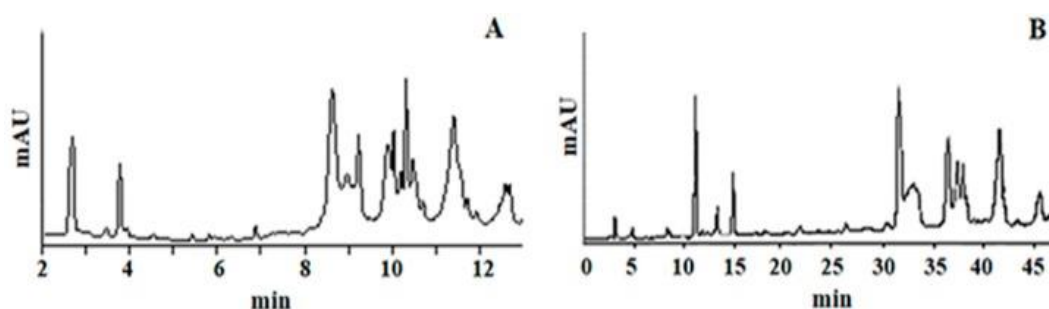
(<http://blog.cromlab.es/compuestos-fenolicos-en-aceite-de-oliva-virgen/>)

En la **Figura 6** se muestra un cromatograma obtenido por HPLC correspondiente al perfil de los biofenoles presentes en un aceite de oliva virgen.

Un segundo método importante es el desarrollado por Tsimidou et al., 2019. La cromatografía líquida de rendimiento ultraalto (UHPLC) tuvo como punto de partida el protocolo de HPLC propuesto por el COI, con algunos ajustes y modificaciones. El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un sistema UHPLC Shimadzu Nexera X2, equipado con un detector de fluorescencia. La determinación se realizó pesando una muestra de aceite de oliva virgen, realizando una mezcla con metanol:agua 80:20 (v/v), y manteniéndola en agitación. La extracción se desarrolla en un baño de ultrasonidos durante 15 min, y se centrifuga, recogiendo el sobrenadante. En esta técnica, la extracción siempre se realiza por triplicado (Tsimidou et al., 2019).

Posteriormente, se realiza una hidrólisis ácida y se filtra a través de una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) antes de inyectar la muestra en el cromatógrafo. La fase móvil consistió en agua (ácido fosfórico al 0,2%), metanol y acetonitrilo con una velocidad de flujo de 0,45 ml/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 35 °C y la de la muestra a 6 °C (Tsimidou et al., 2019).

Teniendo en cuenta las técnicas anteriormente mencionadas, cabe destacar que el tiempo empleado en la determinación mediante UHPLC es 3 veces menor, y el consumo de eluyente para la misma información es 6 veces más pequeño. El único inconveniente que posee es que es un método caro, pero permite analizar un mayor número de muestras con un menor impacto ambiental (Tsimidou et al., 2019).



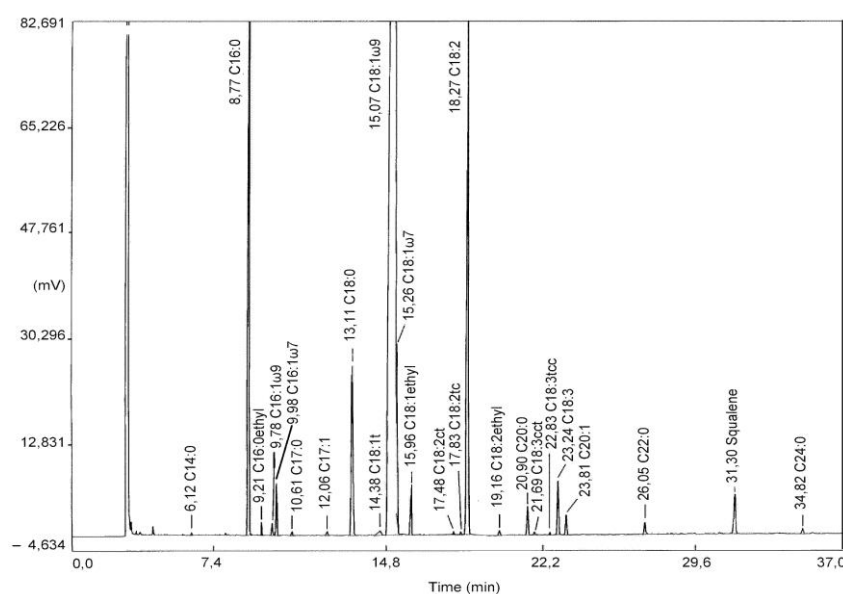
**Figura 7:** El primer cromatograma (A) corresponde al perfil de un aceite de oliva virgen determinado por cromatografía líquida de rendimiento ultraalto acoplada a un detector de matriz de diodos (UHPLC-DAD), mientras que el segundo (B) corresponde a la misma muestra analizada mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de matriz de diodos (HPLC-DAD) (Tsimidou et al., 2019).

En la **Figura 7** se puede examinar la eficacia de separación de UHPLC, frente a la HPLC analizando la misma muestra de aceite de oliva virgen.

### Ácidos grasos

El aceite de oliva es rico en ácidos grasos monoinsaturados como el ácido oleico, contiene cantidades moderadas de ácidos palmítico y linoleico y un porcentaje bajo de ácidos esteárico y linolénico (**Tabla 6**) (De la Osada, 2010). Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, pertenecientes a la familia de los  $\omega$ -3, son imprescindibles para la función neuronal. Además, los ácidos grasos  $\omega$ -6 son los constituyentes de las membranas plasmáticas y modulan procesos como la transmisión de señales, la inflamación, el estrés oxidativo y la inmunidad (Waitzberg Garla, 2014).

Los ácidos grasos se determinan por cromatografía gaseosa siguiendo el procedimiento descrito en el Reglamento (CEE) 2568/91, que consiste en la hidrólisis de los triglicéridos y la transesterificación en frío, con una disolución metanólica de KOH. La disolución que contiene los ésteres metílicos de los ácidos grasos es inyectada en el cromatógrafo de gases, modelo Hewlett-Packard 6890, junto con un detector de ionización de llama (FID). Se empleó una columna capilar DB-23, de 60 m x 0,25 mm d.i. x 0,25  $\mu$ m de espesor de fase estacionaria. El helio fue el gas portador con un flujo de 83,7 ml/min. El análisis se llevó a cabo a una temperatura de 280 °C en el inyector de tipo Split, y el detector a 250 °C. Además, la rampa se utilizó a 10 °C durante 5 minutos hasta alcanzar una temperatura de 220 °C. El perfil de los ácidos grasos se expresa como porcentaje del área de sus ésteres metílicos (Martínez, 2016).



**Figura 8:** Cromatograma de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de un AOV (CEE, 2013).

En la **Figura 8** podemos observar los distintos picos cromatográficos correspondientes a los ésteres metílicos de los ácidos grasos, entre los que destacan el ácido palmítico (16:0), ácido oleico (18:1), ácido linoleico (18:2), además de otros ácidos grasos minoritarios (CEE, 2013).

#### 4.2. Compuestos presentes en el aceite de oliva virgen alterado, deteriorado o contaminado

El aceite de oliva virgen puede sufrir alteraciones, deterioro o contaminación debidas a la presencia de trazas metálicas, plaguicidas, a un mal almacenamiento o por calentamiento mediante la fritura, por la aparición de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). La presencia de estos nuevos compuestos debido a estas circunstancias puede tener un efecto sobre el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas, los cuales son evaluados a continuación.

##### Metales pesados

La peligrosidad de los metales en los aceites de oliva es importante ya que muchos de ellos no se degradan, y repercuten negativamente en la salud del ser humano. Según el Consejo Oleícola Internacional, solo los niveles de hierro y cobre se consideran criterios de calidad en los aceites de oliva, ya que son precursores de oxidaciones, aunque los verdaderos contaminantes son el plomo y el hierro (Bakkali et al., 2009).

Las técnicas analíticas que se utilizan para su determinación son la espectroscopia de absorción molecular UV-Vis, la electroforesis capilar con detección electroquímica y la potenciométrica. Sin embargo, los procedimientos con mayor sensibilidad son las técnicas atómicas, destacando la espectroscopia de absorción atómica con atomización electrotérmica (EAA- AE), la espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado y la determinación de multielementos por espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplada a espectroscopia de masas (Bakkali et al., 2009).

Según Bakkali et al., 2009, el método de tratamiento de muestras mediante el uso de un horno de microondas es un método rápido y se reduce la cantidad de ácido nítrico y peróxido de hidrógenos necesarias para el tratamiento de la muestra. Además, con el empleo de la espectroscopia de absorción atómica con atomización electrotérmica, se determinan los metales con unos límites de detección que fluctúan entre 0,06 y 2,15 µg/kg. El nitrato de magnesio favorece la vaporización de la matriz y minimiza las interferencias en la atomización del analito.

La presencia de trazas metálicas como tal puede generar, además, no solo catalizar reacciones de oxidación de manera general, sino también, en el caso particular de las trazas de cobre o zinc, podríamos encontrar complejos de cobre o zinc de clorofilas en aceites vegetales. Este término se refiere a los compuestos con estructura química de las clorofilas, es decir, formado por un anillo porfirínico sustituido y en algunos casos una cadena térpenica denominada fitol. En el centro del anillo porfirínico en lugar de encontrarse un átomo de  $Mg^{+2}$  unido a los nitrógenos de los grupos pirrol, se encuentra un átomo de  $Cu^{+2}$  o  $Zn^{+2}$ , formando un pigmento químicamente estable. Estos complejos clorofílicos tienen al igual que las clorofilas naturales, una actividad antimutagénica (Ferruzzi and Blackeslee, 2007).

La determinación de los complejos cúpricos del AOV se lleva a cabo a través de una extracción líquido-líquido, con una posterior separación mediante cromatografía líquida de alta resolución. Posteriormente, la detección de los compuestos separados en la etapa anterior, se realiza mediante espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) (Roca et al., 2010).

#### Plaguicidas

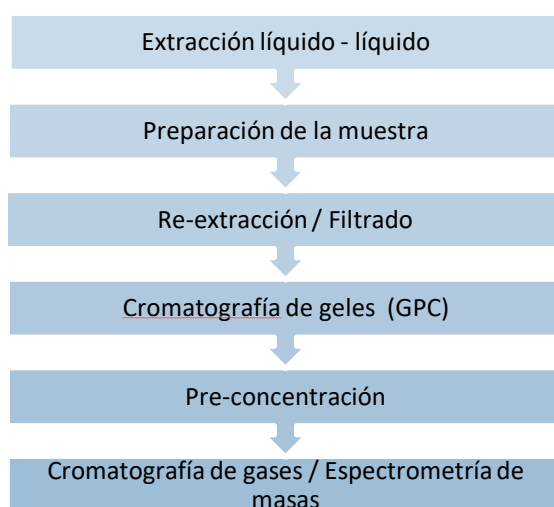
Para garantizar la calidad del aceite, y principalmente de la aceituna, el olivo se trata con compuestos fitosanitarios, entre los que predominan, los plaguicidas (Ballesteros et al., 2007). El uso indebido de estos productos (dosis excesivas, reiterada aplicación, utilización de productos no permitidos, incumplimiento de los plazos de seguridad, etc.) y la contaminación cruzada entre cultivos, da lugar a que las producciones agrícolas contengan residuos de plaguicidas, que potencialmente pueden llegar al consumidor (Garcés, 2008).

La exposición prolongada a los plaguicidas puede originar problemas para la reproducción, la fertilidad, el desarrollo embrionario y fetal, perturbaciones endocrinas, padecimientos neurológicos y problemas de comportamiento psíquico, enfermedades neurodegenerativas, cáncer e incluso, cáncer en neonatos o antes del nacimiento (Gómez, 2016).

Estos compuestos se determinan mediante cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida en columna (CLC), pero anteriormente se realiza un tratamiento de la muestra con el fin de modificar la matriz, extraer los analitos de interés, eliminar los compuestos co-extraídos para evitar interferencias, y derivatizar los pesticidas para facilitar la detección (Ballesteros et al., 2007).

La metodología se basa en la extracción con hexano o éter de petróleo, con una posterior limpieza de los extractos y determinación cromatográfica. La cromatografía de gases o cromatografía líquida en columna son las dos técnicas que predominan. Los detectores de GC

usados son ionización en llama, nitrógeno fósforo, captura de electrones y fotometría de llama. Además, el acoplamiento de la GC a un espectrómetro de masas resuelve los problemas de identificación de los detectores anteriores. Por otro lado, en la CLC, el detector más utilizado es el UV, además de otros como diodos en fila y espectrometría de masas. También, se utilizan otras técnicas no cromatográficas, como la electroforesis capilar para determinar carbamatos, técnicas de inmunoensayo y biosensores para la cuantificación de plaguicidas (Ballesteros et al., 2007). La cromatografía de gases es la más utilizada, especialmente en el caso de plaguicidas organofosforados y organoclorados, mientras que la cromatografía líquida predomina en los plaguicidas polares y termodegradables (Garcés, 2008). En la **Figura 9** se muestra un esquema del proceso para la determinación de plaguicidas.



**Figura 9:** Proceso para la determinación de plaguicidas en el AOV (Ballesteros et al., 2007).

#### Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son compuestos que se generan por combustión incompleta de materia orgánica, y son importantes desde el punto de vista cancerígeno y/o mutagénico. Para generar el efecto cancerígeno, estos compuestos requieren una conversión enzimática (Rodríguez, 2013). Aunque el rango de concentraciones encontrado para cada HAP es bastante amplio, los más comunes son el fenantreno, el antraceno, fluoranteno, pireno y benzo(a)pireno, siendo el último el marcador de la contaminación por HAPs (Rodríguez, 2005).

El análisis de estos compuestos puede realizarse por espectroscopia de fluorescencia asociada a quimiometría, ya que es un método rápido y económico, aunque presenta una baja

selectividad al identificar compuestos químicamente similares en matrices complejas (Rodríguez, 2013).

La técnica más adecuada para la determinación de los HAPs es la cromatografía líquida de alta resolución sobre fase inversa con detector de fluorescencia (HPLC-FLD), debido a la polaridad y estructura de estos compuestos. Dicha técnica presenta una gran sensibilidad y permite separar mejor isómeros de los HAPs que no pueden ser separados bien por cromatografía de gases, además de detectar los HAPs de elevado peso molecular. Las columnas utilizadas son las de C18 de alto contenido en carbono, utilizando acetonitrilo-agua o metanol-agua como fase móvil junto a un gradiente de elución. El detector de fluorescencia de longitudes de onda programables aumenta la sensibilidad de la técnica HPLC-FLD, de forma que se obtenga la máxima respuesta posible para los HAPs y la mínima para las interferencias. Presenta como desventaja menor sensibilidad que la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, por lo que es necesario una mayor purificación de la muestra de aceite (Rodríguez, 2005).

Además, existe otro método para la determinación y cuantificación de HAPs como es la cromatografía de gases, en la que se usan columnas capilares débilmente polares, siendo muy utilizadas por su elevado poder de resolución y por su capacidad de poder acoplarse a distintos detectores. Anteriormente se utilizaban para el análisis de estos compuestos tanto el detector de ionización de llama (FID), como la detección por espectrometría de masas (MS), actualmente este último solo se usa para la detección y cuantificación de los HAPs. Se están introduciendo nuevas técnicas para aislar estos compuestos, como el uso en línea de varios equipos cromatográficos y el uso de fluidos supercríticos. La aplicación de fluidos supercríticos en aceites vegetales comestibles se basa en la utilización del CO<sub>2</sub> supercrítico como fase móvil, y presenta como ventaja la rápida extracción de los analitos, aunque los límites de cuantificación y de determinación son altos y las recuperaciones un poco bajas (Rodríguez, 2005).

Una vez realizado el estudio de los compuestos de un aceite de oliva virgen relacionados con enfermedades cancerígenas o neurodegenerativas provenientes de diferentes vías de contaminación, ya sea por la presencia de trazas metálicas, plaguicidas o HAPs, abordaremos el estudio de los compuestos generados cuando el AOV está expuesto a calentamiento. En la fritura se pueden experimentar tanto transformaciones químicas como cambios físicos, además de un desarrollo de sabor y olor característico (Barbosa et al., 2008). Suelen darse tres tipos de reacciones:

- **Oxidación:** es la reacción que experimenta el aceite con el oxígeno del aire. Los peróxidos son los principales productos de la autooxidación y resultan indeseables, ya que afectan negativamente al sabor del aceite y del alimento freído. La oxidación se asocia a un mayor riesgo de cáncer de mama y enfermedades coronarias. (Barbosa et al., 2008).

Los peróxidos a su vez se degradan a hidroperóxidos cuya descomposición genera productos de oxidación secundarios, entre los que se incluyen compuestos volátiles como aldehídos, cetonas, hidrocarburos, ácidos, ésteres, alcoholes y compuestos aromáticos que producen la alteración del sabor, palatabilidad y oscurecimiento del aceite, además de cambios fisicoquímicos como un aumento de la viscosidad y formación de polímeros (Barbosa et al., 2008).

Los compuestos procedentes de reacciones de oxidación primaria se determinan mediante el índice de peróxidos, y los compuestos procedentes de oxidaciones secundarias, mediante las medidas de absorbancia en el ultravioleta a 232 y 270 nm (Tena, 2010), como se ha definido anteriormente al desarrollar los parámetros de calidad del AOV.

- **Compuestos polares:** son compuestos que se generan como producto de las reacciones secundarias de oxidación de los aceites, y al ser polares suelen tener mayor afinidad con la fase acuosa del alimento. Incluyen sustancias presentes en las grasas sometidas a bajas temperaturas, como monoglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos libres (Barbosa et al., 2008).

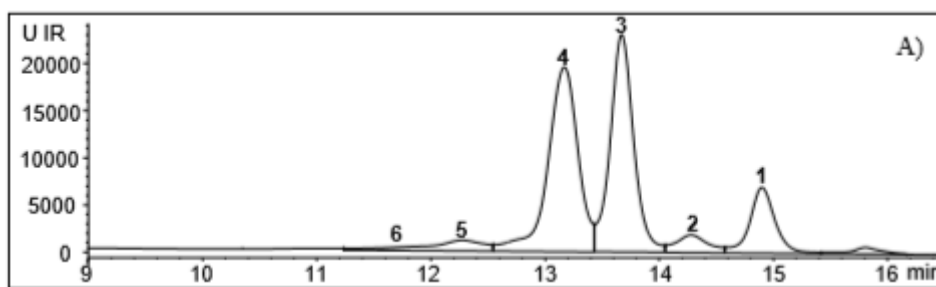
Algunos investigadores han demostrado que cuando se suministran altas cantidades de estos compuestos a animales en experimentación, originan retraso en el crecimiento fetal, hipertrofia o hiperplasia hepática, hígado graso, lesiones tisulares en el corazón y el riñón, además de úlceras gástricas (Barbosa et al., 2008). Según la Orden 2265/1989, en España las grasas de cocinar se consideran gastadas cuando poseen más de un 25% de compuestos polares, y cualquier violación de este valor puede ser penado (Tena, 2010).

La determinación de ácidos grasos oxidados, con previa formación de los ésteres metílicos, se lleva a cabo mediante cromatografía de gases, a través de la determinación del porcentaje de compuestos no eluibles. El método se basa en añadir un peso conocido de un triglicérido homogéneo como patrón interno (triheptadecanoato de glicerol), a un peso conocido de la grasa. A continuación, se preparan los ésteres metílicos de los ácidos grasos, para su posterior inyección en el cromatógrafo con una columna empacutada con una fase estacionaria al 3%

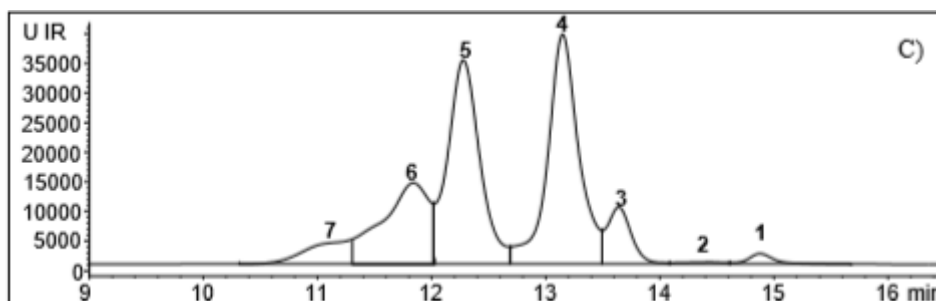


de metilsilicona sobre soporte inerte de tierra de diatomeas. Al comparar el área obtenida para el patrón interno con la suma de áreas totales, se obtiene el valor total de ácidos grasos eluidos, que corresponde al peso total de grasa. La etapa principal para la exactitud de los resultados es la preparación de los ésteres metílicos, para la que se recomienda utilizar exclusivamente una reacción de metóxido sódico, para evitar la transesterificación en medio ácido que puede destruir los ésteres metílicos oxidados (Tena, 2010).

Por otro lado, un método más sistemático es el que combina el fraccionamiento en columna y la determinación gravimétrica de algunas fracciones, en el que los ácidos grasos que se fraccionan en columna se analizan mediante cromatografía líquida de exclusión molecular. Mediante este procedimiento se consigue una evaluación de los aceites de fritura en relación con los porcentajes de las fracciones cuantificadas de los siguientes compuestos polares: polímeros de los ácidos grasos, dímeros de ácidos grasos no polares, monómeros de ácidos grasos no polares, dímeros de ácidos grasos oxidados y monómeros de ácidos grasos oxidados (Tena, 2010). En las **Figuras 10 y 11** se muestran dos cromatogramas de exclusión molecular de la fracción polar de una muestra de AOV.



**Figura 10:** Cromatograma de exclusión molecular de la fracción polar de la muestra de aceite de oliva virgen inicial (Tena, 2010).



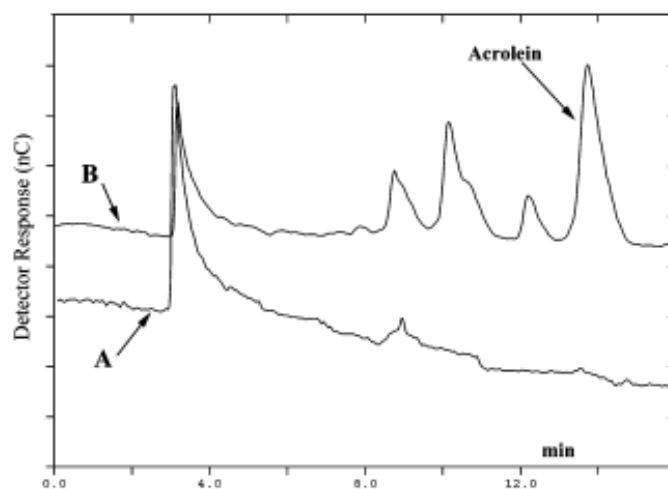
**Figura 11:** Cromatograma de exclusión molecular de la fracción polar de la muestra de aceite de oliva virgen tras 38 horas de termoxidación (Tena, 2010).

Siendo los números representados en las **Figuras 10 y 11**: 1, ácidos grasos oxidados; 2, fracción polar del insaponificable; 3, diglicéridos oxidados; 4, triglicéridos oxidados; 5, dímeros polares; 6, oligómeros polares y 7, polímeros polares (Tena, 2010).

- **Hidrólisis:** esta reacción se produce por la presencia de agua, humedad o calor, y da lugar a la formación de ácidos grasos libres. Un incremento de la acidez origina la acroleína, siendo ésta una sustancia irritante y cancerígena (Barbosa et al., 2008).

Durante el calentamiento de los aceites se produce la emisión de compuestos orgánicos volátiles, entre los que se incluyen los aldehídos, y entre los que predomina la acroleína. Esta sustancia puede exacerbar el asma en los niños (Seaman et al., 2009), además de producir aterosclerosis, carcinogénesis y envejecimiento. Su citotoxicidad se debe a la reactividad de los grupos sulfhidrilo en las proteínas y el glutatión, lo que conduce a la interferencia con el metabolismo celular (Casella Contursi, 2004).

La determinación de la acroleína en aceites vegetales calentados se puede realizar mediante cromatografía líquida con detección electroquímica pulsada. Este método describe una forma de onda pulsada de triple paso optimizada, basada en la formación/inhibición de especies de PtOH en la superficie del electrodo, siendo una consecuencia de la ausencia/presencia de analitos adsorbentes. Se trata de un método sensible, de alto rendimiento, que presenta una buena selectividad y reproductibilidad analítica (Casella and Contursi, 2004). La separación cromatográfica del aceite de oliva antes y después de someterse a un calentamiento a 145 °C durante dos horas, origina la formación de un pico correspondiente a la acroleína, que se puede observar en la **Figura 12** (Casella and Contursi, 2004).



**Figura 12:** Cromatograma correspondiente a una muestra de aceite de oliva antes (A) y después (B) del tratamiento térmico (Casella and Contursi, 2004).

## 5. CONCLUSIONES

El aceite de oliva virgen es uno de los principales componentes de la dieta Mediterránea, ya que posee propiedades beneficiosas desde el punto de vista de la salud. Los efectos más potentes son los desarrollados por los denominados Virgen Extra y Virgen, cuando se administran en crudo. Tras la realización de la revisión bibliográfica, se indica una serie de conclusiones obtenidas como resultado del desarrollo del trabajo:

1. En el AOV en condiciones óptimas podemos encontrar clorofilas, carotenoides, tocoferoles y compuestos triterpénicos que poseen propiedades anticancerígenas, cuya determinación se realiza mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), mientras que el escualeno se determina por cromatografía de gases (GC).
2. Entre los compuestos del AOV “fresco” también podemos encontrar compuestos que poseen su principal actividad protectora frente a las enfermedades neurodegenerativas, como son los fenoles que se analizan mediante HPLC y UHPLC, y los ácidos grasos cuya determinación se realiza por cromatografía de gases.
3. La alteración, deterioro o contaminación del AOV puede ser debido a la presencia de trazas metálicas, plaguicidas o HAPs, cuya determinación se realiza por técnicas atómicas, cromatografía de gases y HPLC sobre fase inversa con detector de fluorescencia, respectivamente.
4. Además, el AOV se puede deteriorar debido a transformaciones químicas o físicas cuando está expuesto a calentamientos, como por ejemplo en la fritura, dando lugar a distintos compuestos cancerígenos entre los que destacan la acroleína y los compuestos polares. La determinación de éstos últimos, se realiza mediante cromatografía de gases con una previa preparación de los esteres metílicos, mientras que la determinación de la acroleína se basa en una cromatografía líquida con detección electroquímica pulsada.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Ahmad Farooqi A, Fayyaz S, Silva AS, Sureda A, Nabavi SF, Mocan A, Nabavi SM, Bishayee A. Oleuropein and cancer chemoprevention: The link is hot. *Molecules*. 2017; 22(5): 1-13.

Angeloni C, Malaguti M, Barbalace MC, Hrelia S. Bioactivity of olive oil phenols in neuroprotection. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(11): 1-27.

Bakkali K, bar B, Souhail B, Ramos Martos N. Determinación de trazas metálicas en aceites vegetales de España y Marruecos mediante espectroscopia de absorción con cámara de grafito después de la digestión en horno de microondas. 2009; 60(5): 490-497.

Ballesteros Tribaldo E, Ramos Martos N, García Sánchez A. Residuos tóxicos en aceite de oliva, determinación de plaguicidas. Jaén. 2007: 507-716.

Barbosa K.B.F, Bressan J, Zulet M.A, Martínez J.A. Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos. *Anales Sis San Navarra*. 2008; 31(3): 259-280.

Casella IG, Contursi M. Quantitative analysis of acrolein in heated vegetable oils by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J Agric Food Chem*. 2004; 52: 5816 – 5821.

CEE. Reglamento de Ejecución (UE) n° 1348/2013 de la Comisión, de 16 de diciembre de 2013, que modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/ 91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 2013; 338: 31-67.

Cert A, Moreda W, García-Moreno J. Determinación de esteroides y diolcoholes triterpénicos en aceite de oliva mediante separación de la fracción por cromatografía líquida de alta eficacia y análisis por cromatografía de gases. Estandarización del método analítico. *Grasas y aceites*. 1997; 48(4): 207-218.

Ching-Yun H, Yue-Hwa C, Pi-Yu C, Chiao-Ming C, Ling-Ling H, Shene-Pin H. Naturally occurring chlorophyll derivatives inhibit aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adduct formation in hepatoma celx. *Mutation Research* 657. 2008; 98-104.

Choe E, Min DB. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Food Science and Food Safety*. 2006; 5(4): 169-186.

COI. Consejo Oleíco Internacional [En línea]. [Consultado en Mayo 2019]. Disponible en: [http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/98-olive-oil-and-skin?lang=en\\_US](http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/98-olive-oil-and-skin?lang=en_US)

COI. Determinación de la composición y del contenido en esteroides mediante cromatografía de gases con columna capilar. COI/T.20/nº 10/Rev 1. Madrid: Consejo Oleíco Internacional, 2001.

COI. Determination of the composition and content of sterols, triterpenic dialcohols and aliphatic alcohols by capillary column gas chromatography. COI/T.20/nº 26/Rev 3. Madrid: Consejo Oleíco Internacional, 2018.

COI. Determination of the difference between actual and theoretical content of triacylglycerols with ECN 42. COI/T. 20/nº20/Rev 4. Madrid: Consejo Oleíco Internacional, 2017.

COI. Determination of wax content by capillary column gas chromatography. COI /T.20/ nº18/ Rev 2. Madrid: Consejo Oleíco Internacional, 2003.

COI. Method for the determination of sterenes in refined vegetable oils. COI/T.20/ nº16/Rev 2. Madrid: Consejo Oleíco Internacional, 2017.

COI. Method for the determination of stigmastadienes in vegetable oils. COI/t.20/nº11/Rev 11. Madrid: Consejo Oleíco Internacional, 2017.

COI. Method for the determination of the percentage of 2-glyceryl monopalmitate. COI/T.20/ nº23/Rev 1. Madrid: Consejo Oleíco Internacional, 2017.

COI. Método de valoración organoléptica del aceite de oliva virgen extra que opta a una denominación de origen. COI/T.20/nº22. Madrid: Consejo Oleíco Internacional, 2005.

COI. Trade Standard applying to olive oils and olive pomace oils. COI/T. 15/NC nº3/Rev 12. Madrid: Consejo Oleíco Internacional, 2018.

Corona G, Spencer JP, Dessi MA. Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract. *Toxicol Ind Health*. 2009; 25(4-5): 285-293.

De la Osada García J. Aceite de Oliva virgen extra y prevención de la aterosclerosis. Zaragoza. 2010.

Esencia de olivo. El aceite de olive virgen extra de Jaén es sabor, es salud, es cultura, es dieta mediterránea y sabiduría en la cocina. 2019 [En línea]. [Consultado en Junio 2019]. Disponible en: <http://www.esenciadeolivo.es/cultura-del-olivo/cultivo/la-aceituna-el-fruto-del-olivo/>

Farr SA, Price TO, Dominguez LJ, Motisi A, Saiano F, Niehoff ML, Morley JE, Banks WA, Ercal N, Barbagallo M. Extra virgin olive oil improves learning and memory in SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis*. 2012; 28(1): 81-92.

Ferran Font MD. Hidroxitirosol, el mejor antioxidante natural y el más desconocido. Estudio comparativo con otros antioxidantes. Cataluña. 2015.

Ferruzzi MG, Blakeslee J. Digestion, absorption and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. Nutrition Research 27. 2007; 1-12.

Gandul-Rojas B, Roca M, Gallardo-Guerrero L. Chlorophylls and carotenoids in food products from olive. Products from Olive Tree. 2016; 67-97.

Garcés García M. Inmunoensayos rápidos para la determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en aceite de oliva. Valencia. 2008.

García Moreno T. Aceite de oliva, fuente y esperanza de salud para el cáncer de colon. La Laguna. 2016.

Godoy Caballero MP. Nuevas propuestas de procedimientos analíticos sencillos para la cuantificación de compuestos fenólicos presentes en la fracción minoritaria del aceite de oliva. 2013.

Gómez Almenar MC. Desarrollo de una nueva metodología rápida para la determinación de la contaminación superficial por residuos de pesticidas en aceitunas. Jaén. 2016.

Laboratorio Complementos Nutricionales. Complementos con vitamina E. 2018 [En línea]. [Consultado en Junio 2019]. Disponible en: <http://www.laboratoriolcn.com/vitaminas-e-y-patologias-cronicas-dp1>

Lanzón A, Guinda Garín MA, Albi T, de la Osa C. Método rápido para la determinación del escualeno en aceites vegetales. Instituto de la grasa y sus derivados. 1995; 46(4-5): 276-278.

Loyola López N, López Acevedo R, Acuña Carrasco C. Sensorial and analytical evaluation of the extra-virgin oil quality. IDESIA. 2008; 26(2):27-44.

Martínez Alvarez JR, Villarino Marín A, Serrano Morago L, Lezcano Martín C, Urrialde de Andrés R, Sánchez Muñiz FJ, Castro Alija MJ, Cao Torija MJ. El aceite de oliva y la dieta Mediterránea. 2006. Madrid. Disponible en: <http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=ContentDisposition&blobheadervalue1=filename%3DT047+.pdf&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1352883450692&ssbinary=true>

Martínez Cano M. Caracterización de aceites de oliva virgen elaborados en zonas oleícolas de Extremadura. 2016.

Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM, Heredia FJ. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN). 2004; 54(2): 149-155.

Monti MC, Margarucci L, Riccio R, Casapullo A. Modulation of tau protein fibrillization by oleocanthal. J Nat Prod. 2012; 75(9): 1584-1588.

Morató J, Xicota L, Fitó M, Farré M, Dierssen M, De la Torre R. Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. 2015; 20(3):4655-80.

Nocella C, Cammisotto V, Fianchini L, D'Amico A, Novo M, Castellani V, Stefanini L, Violi F, Carnevale, R. Extra virgin olive oil and cardiovascular diseases: benefits for human health. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2018; 18(1): 4–13.

Prevención de la contaminación en la producción de aceite de oliva. Centro de Actividades Regionales Para La Producción Limpia, 2000. (CAR/PL). 138.

Priore P, Gnoni A, Natali F, Testini M, Gnoni GV, Siculella L, Damiano F. Oleic Acid and hidroxytyrosol inhibit cholesterol and fatty acid synthesis in C6 Glioma cells. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2017.

Quirantes Piné R, Domínguez Corona JJ, Segura Carretero A, Fernández Gutiérrez A. Técnicas de análisis del aceite de oliva. En: Fernández Gutiérrez A, Segura Carretero A (Eds). El aceite de oliva virgen: tesoro de Andalucía. 13 perspectivas concatenadas. 1ª Ed. Arguval Ediciones, S.A. 2010: 249-285.

Roca M, Gallardo Guerrero L, Gandul-Rojas B. Procedimiento de detección de complejos cúpricos de clorofilas en aceites vegetales. Madrid. 2010.

Rodríguez Acuña R. Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en aceites de oliva. Sevilla. 2005.

Ruiz Domínguez ML. Prácticas de laboratorio para el análisis de aceite de oliva virgen. Proyecto mejora de las economías regionales y desarrollo local. 2015.

Sánchez Quesada C. Estudio de las propiedades antitumorales, antioxidantes y antiinflamatorias de los principales triterpenos del aceite de oliva virgen utilizando modelos experimentales celulares de mama. Jaén. 2014.

Sánchez Rodríguez E, D Mesa M. Compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen. *Nutrición Clínica en Medicina*. 2018; (2): 80-94.

Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, De Sanctis P, Giovannini C, D'Archivio M, Masella R. Anti-inflammatory activity of extra virgin olive oil polyphenols: which role in the prevention and treatment of immune-mediated inflammatory diseases? *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018; 18(1): 36–50.

Sayago A, Marín MI, Aparicio R, Morales MT. Vitamina E y aceites vegetales. *Grasas y aceites*. 2007; 58(1): 74-86.

Seaman VY, Bennet DH, Cahill TM. Indoor acrolein emission and decay rates resulting from domestic cooking events. *Atmospheric environment*. 2009; 43(39): 6199-6204.

Serra G, Incani A, Serreli G, Porru L, Melis MP, Tuberoso CIG, Rossin D, Biasi G, Deiana M. Olive oil polyphenols reduce oxysterols-induced redox imbalance and pro-inflammatory response in intestinal cells. *Redox Biol*. 2018: 348-354.

Tena Pajuelo N. Evolución de componentes mayoritarios y minoritarios de Aceites de Oliva termoxidados: Implementación de métodos espectroscópicos y cromatográficos. Sevilla. 2010.

Tsimidou MZ, Sotiropoulou M, Mastralexi A, Nenadis N, García-González DL, Gallina Toschi T. In house validated UHPLC protocol for the determination of the total hydroxytyrosol and tyrosol content in virgin olive oil fit for the purpose of the health claim introduced by the EC Regulation 432/2012 for "Olive Oil Polyphenols". *Molecules*. 2019; 24(6): 1-16.

Waitzberg DL, Garla P. Contribución de los ácidos grasos omega-3 para la memoria y la función cognitiva. *Nutr Hosp*. 2014; 30(3): 467–477.

Zamora Ardoy MA, Báñez Sánchez F, Báñez Sánchez C, Alaminos García P. Aceite de oliva: influencia y beneficios sobre algunas patologías. *An Med Interna*. 2004; 21(3): 50-54.